

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 09 30

申 请 号： 02 1 34869.3

CFP-14549

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 多基因载体的构建方法与应用

申 请 人： 华南农业大学

发明人或设计人：刘耀光

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 景 川

2003 年 4 月 17 日

权利要求书

1. 一种多基因载体的构建方法, 其特征在于由 1 个接受载体和至少 2 个供给载体组成的多基因组装载体系统, 利用特异重组方法使不同的供给载体交替地和接受载体进行 2 轮以上的基因组装, 构建多基因载体。

2. 根据权利要求 1 所说的方法, 其特征在于所说的接受载体:

(1) 具有 1 个特异重组位点 RS;

(2) 在 RS 近旁具有 1 个位点 S1, 可以是内切酶 homing endonuclease 位点, 或是限制性内切酶位点, 或是不可逆特异重组位点;

(3) 具有 1 个不同于供给载体含有的选择标记基因;

(4) 具有负载量大的复制子元件。

3. 根据权利要求 1 所说的方法, 其特征在于所说的供给载体 I 和供给载体 II:

(1) 具有 1 个特异重组位点 RS, 它与接受载体的 RS 相同或能够与接受载体的 RS 发生特异重组;

(2) 具有 1 个位点 S1 和另 1 个位点 S2, 可以是内切酶 homing endonuclease 位点, 或是限制性内切酶位点, 或是不可逆特异重组位点;

(3) 具有一个多克隆位点 MCS;

(4) 供给载体 I 中的 RS、S1、S2、和 MCS 位点按 RS-S2-MCS-S1 的相对位置排列;

(5) 供给载体 II 中的 RS、S1、S2、和 MCS 位点按 RS-S1-MCS-S2 的相对位置排列;

(6) 具有 1 个不同于接受载体含有的选择标记基因。

4. 根据权利要求 1 所说的方法, 其特征在于由所说的接受载体和供给载体 I 和供给载体 II 组成多基因组装载体系统, 利用特异重组方法通过供给载体 I 和供给载体 II 交替地和接受载体进行 2 轮以上的基因组装,

构建多基因载体，具体组装的步骤为：

(1) 把目的基因或 DNA 片段按需要组装的次序排号，用常规的分子克隆技术把单序数和双序数的基因或 DNA 片段分别亚克隆到供给载体 I 和供给载体 II 的多克隆位点 MCS；1 个供给载体可以亚克隆 1 个以上的基因片段；

(2) 把载有基因 1 的供给载体 I 质粒和接受载体质粒共转化到含有特异重组酶基因的大肠杆菌宿主，使 2 种质粒中的特异重组位点 RS 发生重组，或用分离纯化的特异重组酶进行试管内反应使 2 种质粒重组整合；用接受载体和供给载体的选择标记筛选整合质粒；用切割 S1 位点的内切酶切除整合质粒中 2 个 S1 位点之间的供给载体骨架片段，用 T4 DNA 连接酶和双链寡核苷酸接头把含有基因 1 的接受载体连接成环状；如 S1 是不可逆特异重组位点，用相应的特异重组酶去除整合质粒中 2 个 S1 位点之间的供给载体骨架片段并同时完成载体的环化；此步骤获得载有基因 1 的新接受载体；

(3) 把载有基因 2 的供给载体 II 质粒和载有基因 1 的新接受载体质粒共转化到含有特异重组酶基因的大肠杆菌宿主，使 2 种质粒中的特异重组位点 RS 发生重组整合，或用分离纯化的特异重组酶进行试管内反应使 2 种质粒重组整合；用接受载体和供给载体的选择标记筛选整合质粒，用切割 S2 的内切酶切除整合质粒中 2 个 S2 位点之间的供给载体骨架片段，用 T4 DNA 连接酶和双链寡核苷酸接头把含有基因 1 的接受载体连接成环状；如 S2 是不可逆特异重组位点，用相应的特异重组酶去除整合质粒中 2 个 S2 位点之间的供给载体骨架片段并同时完成载体的环化；此步骤获得载有基因 1 和基因 2 的新接受载体；

以装载有目的基因的新质粒为接受载体，不断交替重复所述步骤(2)和步骤(3)，即按步骤(2)操作将单序数基因整合进接受载体，按步骤

(3) 操作将双序数基因整合进接受载体，直到完成所有目的基因或 DNA 片段的组装，构建成多基因载体。

5. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所说的方法构建的接受载体和供给载体，

其特征在于接受载体为植物基因转化载体 pYLTAC747, 供给载体 I 为 pYLVS, 供给载体 II 为 pYLSV。

6. 根据权利要求 5 所说的接受载体和供给载体, 其特征在于接受载体 pYLTAC747 具有序列表中序列 1 的 DNA 序列, 供给载体 pYLVS 具有序列表中序列 2 的 DNA 序列, 供给载体 pYLSV 具有序列表中序列 3 的 DNA 序列。

7. 权利要求 1 所说的多基因载体构建方法的应用, 其特征在于把多个基因或 DNA 片段装载到一个载体, 构建成基因工程载体包括转化表达载体, 用此载体把多个基因一起转化受体生物细胞, 获得多种基因工程产品或多个基因的表达性状。

说明书

多基因载体的构建方法与应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域,尤其是基因工程载体的构建及其应用。

背景技术

基因转化是生物基因工程的基本技术。现有的基因转化技术主要被用于向生物细胞导入少数,通常1—3个基因。近年来人们试图转化更多基因,但受现有技术的限制,多基因载体构建和多基因转化还很困难,效率很低。

目前的基因工程实践中进行多基因转化的可能方法有:

(1) 把多个分别含不同基因的载体质粒混合,用基因枪轰击等方法进行共转化(Chen *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 2000)。

(2) 把多个基因分组,如每组1—3个基因,分别亚克隆在载体上,对同一受体进行多轮转化(Lapierre *et al.*, 1999);或将各个载体分别转化生物受体,再将转化体互相杂交使多个基因重组在一起(Ma and Hiatt, 1995)。

(3) 用常规的分子克隆技术把尽可能多的基因连接在同一个载体上进行共转化(Van Engelen *et al.*, 1994; Daniell *et al.*, 2001)。

方法(1)虽然操作简单,但是基因数目越多,所有基因都能共转化一个细胞的频率越低。并且各个基因的导入拷贝数不能控制,有些基因的导入拷贝数可能很多,有些却没有导入。方法(2)要解决转化体的选择标记的剔除问题,或者要选用不同的选择标记,才能进行下一轮的转化。多轮转化或转化体相互杂交重组筛选需要的时间也较长,因而实际应用不多。方法(3)是最常用的方法。但现有的分子克隆技术一般只能将数目不多的基因,如2—4个基因连接在一个载体。要将更多的基因克

P

克隆到一个载体，用现有的分子克隆技术是很困难的。这种困难性主要在于：（1）把多个外源 DNA 片段顺次连接到一个载体时，随着插入片段数的增多，载体总长度增大，可利用的克隆位点即唯一的限制性内切酶切位点越少，直到没有酶切位点可用；（2）随着插入片段数的增多载体变得越大时，新的片段连接到载体的效率变得很低，特别是对平滑末端片段的连接就非常困难；（3）目前通常使用的多拷贝质粒载体如 pUC 系列及其衍生物的接受外源 DNA 的负载量较低，难以克隆多个基因片段。虽然有一类基于 F 因子或 P1 复制子的载体如细菌人工染色体（BAC、P1）、双元细菌人工染色体（BIBAC）、和可转化人工染色体（TAC）的负载量较大（Sternberg *et al.*, 1990; Shizuya *et al.*, 1992; Halmilton, 1997; Liu *et al.*, 1999），但由于上述原因，这些载体只适合进行一次连接反应克隆一个大的 DNA 片段，不适合进行多次连接反应克隆多个不同来源的 DNA 片段。

DNA 分子之间可以在特定的重组酶作用下发生重组交换，称为 DNA 重组。DNA 重组是重组酶对 2 个 DNA 位点进行切割和交换连接的连续过程。现已发现了多种重组系统。特异重组系统如 Cre/LoxP、RLP/FRT、R/R、attB/attP、Gin/Gix 等可使 2 个特异重组位点之间在特异重组酶的作用下发生重组，因而可用于基因的整合或切除（Sternberg *et al.*, 1981; Nash, 1981; Mcleod *et al.*, 1986; Merker *et al.*, 1993）。例如，Cre 重组酶可使分别有 1 个 LoxP 特异重组位点（由 34 碱基对组成）的 2 个质粒之间发生重组，将它们整合成 1 个质粒。另一方面，这个整合质粒中存在的 2 个同向排列的 LoxP 位点之间又会发生重组即逆向重组，使整合质粒分离回 2 个质粒。虽然利用特异重组系统可以进行基因整合是周知的技术，但现有的方法只能用此技术进行 1—2 轮的基因整合，还没有进行 2 轮以上基因组装的有效方法。

本发明的目的是提供一种多基因载体的构建方法，将多个基因或 DNA 片段有效地组装到一个基因工程载体，构建成多基因载体，为基因工程研究和应用提供有效的工具。

发明内容

从原理上说, 利用特异重组技术进行多轮的质粒载体整合, 可以把多个基因或 DNA 片段组装在一起。但要进行第 2 轮或更多轮的基因整合, 要解决的一个关键问题是每一轮基因整合时如何把整合质粒中的一个载体即供给载体的骨架序列切除, 即将含有 1 个特异重组位点、质粒复制原点、以及选择标记如抗生素标记基因的骨架片段去除。只有去除了这个骨架片段, 才能进行下一轮的整合。这是因为: (1) 整合质粒是 2 个质粒的叠加, 存在 2 个复制原点和 2 个同向排列的特异重组位点, 因而在细菌宿主中不稳定, 在宿主重组酶或外源重组酶的作用下会发生逆向重组分离成 2 个质粒; (2) 必须用 2 个质粒分别携带的不同选择标记筛选整合质粒, 不切除前一轮供给载体的选择标记, 新一轮供给载体就必须使用新的选择标记, 而可利用的选择标记种类是很有限的。

因此, 利用特异重组技术进行多次的基因重组及其切除供给载体骨架的过程要解决 2 个主要技术难题: (1) 切除供给载体骨架时必须是不能切断已整合的基因和接受载体; (2) 每一轮基因整合都有适当的切割位点用于将供给载体骨架的切除。但是每一轮整合时用于切除供给载体骨架的切割位点如果没有被破坏, 该位点在以后的基因整合时就不能再用于供给载体骨架的切除。当已整合的基因越多, 就越难找到可利用的切割位点。

基因工程所用的内切酶中, 通常将对 DNA 序列切割频度较低的称为稀有内切酶。其中有一类内切酶称为 homing endonuclease 或 meganuclease, 如 I-SceI、I-CeuI、I-PpoI、I-TliI、PI-SceI (VDE)、和 PI-PspI。Homing endonuclease 的识别切割位点有如下特点: (1) 识别序列较长, 如 I-SceI 识别 18 碱基对的位点, PI-SceI 识别 39 碱基对的位点, 因此在基因或 DNA 片段中自然出现与这些位点完全一致的序列的机率极低 ($I-SceI=4^{-18}$, $PI-SceI=4^{-39}$); (2) 识别序列是非对称结构, 当 2 个方向相反的位点之间的片段被 homing endonuclease 切除后再将两端连接, 产生的连接点不再是一个完整的识别切割位点, 不能被该酶

识别和切割。特异重组通常是可逆的，但有些特异重组系统如 *attB/attP* 和一些经过修饰改变的特异重组位点也可以使重组单向进行，即重组交换后产生的新位点即连接点不能再参与回复重组，称为不可逆特异重组。不可逆特异重组可以用于切除 2 个重组位点之间的 DNA 片段，并同时完成 2 个末端的连接。

根据对以上技术问题的认识和理解，本发明设计了有效的多基因组装的解决方案。本发明的多基因组装方法是这样实现的：构建由 1 个接受载体和 2 个供给载体组成的多基因组装载体系统，利用特异重组方法使含有目的基因的不同供给载体交替地和接受载体进行多轮的质粒整合，并交替使用按特别方式设计在接受载体和 2 个供给载体上的 2 种稀有内切酶位点或不可逆特异重组位点切除整合质粒中的供给载体骨架片段，使多轮的基因整合能有效进行，直到完成多基因载体的构建。本发明的技术方案之一是利用 homing endonucleas 的上述特点，能有效地避免切除供给载体骨架时切断已整合的基因或接受载体。而交替重复地使用 2 种内切酶位点或不可逆特异重组位点，使每一轮基因整合时都有切割位点用于供给载体骨架的切除。

所述的接受载体是多基因组装过程中接受和承载外源基因片段的载体，其主要特征是：

- (1) 具有 1 个特异重组位点 RS；
- (2) 在 RS 位点的近旁有 1 个位点 S1，可以是内切酶 homing endonuclease 位点或限制性内切酶位点，也可以是不可逆特异重组位点；
- (3) 具有 1 个不同于供给载体含有的选择标记基因，可以是但不限于抗生素标记基因；
- (4) 载体的复制子是负载容量较大的复制子，可以使用但不限于 P1 复制子、F 因子复制子、Ri 复制子、pVS1 复制子。

所述的 2 个供给载体即供给载体 I 和供给载体 II 是多基因组装过程中将目的基因往接受载体输送的载体，它们的主要特征是：

- (1) 具有 1 个特异重组位点 RS，它与接受载体的 RS 相同或能够与接

受载体的 RS 发生特异重组;

(2) 具有 1 个位点 S1 和另 1 个位点 S2, 可以是内切酶 homing endonuclease 位点或限制性内切酶位点, 也可以是不可逆特异重组位点;

(3) 在 2 个供给载体中, RS、S1、S2、以及多克隆位点 MCS 按以下相对位置排列:

供给载体 I: RS—S2—MCS—S1

供给载体 II: RS—S1—MCS—S2

(4) 供给载体 I 和供给载体 II 具有 1 个不同于接受载体含有的选择标记基因, 可以是但不限于抗生素标记基因; 供给载体 I 和供给载体 II 具有的选择标记基因可以相同, 也可以不相同。

所述的特异重组位点 RS 可以是但不限于 LoxP、FRT、R、attB、attP、或 Gix。

所述的 homing endonuclease 位点可以是但不限于 I-SceI、I-CeuI、I-PpoI、I-TliI、PI-SceI (VDE)、或 PI-PspI。

所述的不可逆特异重组位点可以是但不限于 attB、attP、修饰 attB、修饰 attP、修饰 LoxP、修饰 FRT、修饰 R、或修饰 Gix。

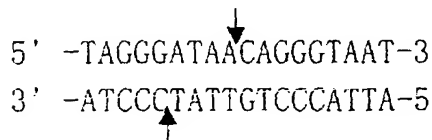
现结合附图及具体实施例对本发明的内容作进一步说明。本说明以实际构建的载体为例, 但不构成对本发明权利要求的限制。

图 1 为多基因组装载载体系统结构图, 由 **A**、**B**、**C** 所示的 3 个载体组成。其中 **A** 为接受载体, 命名为 pYL747; **B** 为供给载体 I, 命名为 pYLV; **C** 为供给载体 II, 命名为 pYLSV。LoxP 为所述的 RS, 是 Cre 重组酶的特异重组位点; I-SceI 为所述的 S1, 是一种 homing endonuclease 内切酶 I-SceI 的识别切割位点; PI-SceI 为所述的 S2, 是另一种 homing endonuclease 内切酶 PI-SceI 的识别切割位点; MCS 为多克隆位点, 有用于外源基因插入的多个限制性内切酶位点; LacZ 为半乳糖苷酶基因选择标记; Kan 为抗卡那霉素标记基因; Cm 为抗氯霉素标记基因; RB, LB 分别为转移 DNA 区即 T-DNA 区的右边界和左边界; Pl plasmid replicon

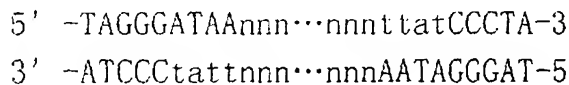
为来源于发根农杆菌 Ri 质粒的复制子, 可在发根农杆菌和根癌农杆菌起质粒复制作用; Ori 为 pUC 质粒复制起始点。

图 2 为多基因组装的流程图, 其中图 2 之一为基因 1 或单序数基因的组装过程, 图 2 之二为基因 2 或双序数基因的组装过程。本图只示出 2 个组装循环。图中省略了 pYL747 的 RB 与 LB 以外的载体骨架部分。

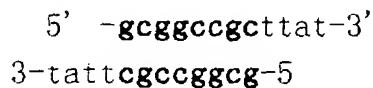
I-SceI 的识别序列和切断点 (箭头所示) 为:



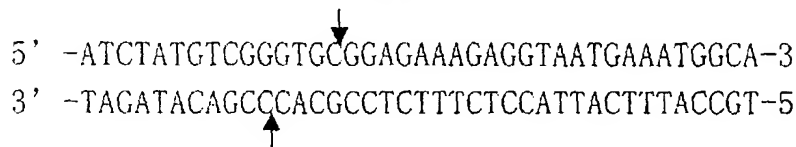
2 个方向相反的 I-SceI 切割片段末端与寡核苷酸接头 S (小写字母表示) 连接产生的连接点为:



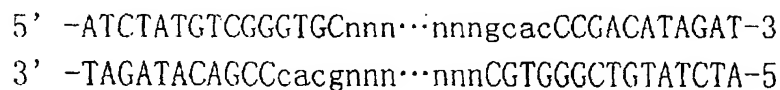
接头中的碱基数 (n) 一般 8 个或 8 个以上, n 可以是任何碱基, 但不能形成完整的 I-SceI 或 PI-SceI 识别序列。在本发明的实施例中 (图 5 和图 6), 接头 S 内设计了限制性内切酶 NotI:



PI-SceI 的识别序列和切断点 (箭头所示) 为:



2 个方向相反的 PI-SceI 切割片段末端与寡核苷酸接头 V (小写字母表示) 连接产生的连接点为:



接头中的碱基数 (n) 一般 8 个或 8 个以上, n 可以是任何碱基, 但不

1X

001010

能形成完整的 PI-*SceI* 或 I-*SceI* 识别序列。在本发明的实施例中（图 5 和图 6），接头 V 内设计了限制性内切酶 *NotI*：

5' -**gcggccgc**gcac-3'
3-cagc**cgccggcg**-5'

图 3 为构建接受载体 pYLAC747 的示意图。

引物 P1 为：5' -CTCATGTCTAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGT-3，标下线部分为限制性内切酶 *XbaI* 位点。

引物 P2 为：5' -ACCGGATCCTGTTTACACCACAATATATCCTGCCACGTAAAGACTTCAT-3，标下线部分为限制性内切酶 *BanHI* 位点，斜体部分是 T-DNA 左边界 LB。

MCS-*LoxP*-I-*SceI* 片段（序列表中的序列 1）为：

5'-GGATCCAAGCTTGTGCGACGGCCGGCCGCGCCGCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGGGCCGCATTACCCTGTTATCCCTAGGCCCAATTAGGCCTACCCACTAG-3'

标下线部分为由 *BanHI*、*HindIII*、*FseI*、和 *NotI* 组成的多克隆位点 MCS，斜体部分为 *Lox* 位点，斜体加下线部分是 I-*SceI* 位点。

图 4 为构建供给载体 pYLVS 和 pYLSV 的示意图。

pCambia1200 和 pBluescript SK：质粒载体；Ori：质粒复制起始点；Cm：氯霉素抗性基因；Amp：氨苄青霉素抗性基因。LacZ：半乳糖苷酶基因选择标记。

引物 P3 为：5' -CTTCAATATTACGCAGCA-3

引物 P4 为：5' -GAGCAATATTGTGCTTAG-3

引物 P5 为：5' -GTTCTCGCGGTATCATTG -3

引物 P6 为：5' -CCATTCGCCATTCAGGCTG -3

供给载体 I 质粒 pYLVS 中的 *LoxP*-PI-*SceI*-MCS-I-*SceI* 区间序列（序列表中的序列 2）为：

5'-GCGCGCTCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCAGATCTTTTGGCTAC

CTTAAGTGCCATTTCATTACCTCTTTCTCCGACCCGACATAGATGTTAAGAGAGTCATAT
CGATGCATGCGGCCGCTAGCTCGAGCTCTAGAATTCTGCAGGTACCGCGGATCCATGGGCC
CGGGACTAGTCGACATGTACAAGCTTG TAGGGATAACAGGGTAATCCCTAAGATCTCAGCG
CGC-3

供给载体 II 质粒 pYLSV 中的 *LoxP*—*I-SceI*—MCS—*PI-SceI* 区间序列
(序列表中的序列 3) 为:

5'-GCGCGCTCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCAGATCTTAGGGATTAC
CCTGTTATCCCTACAAGCTTGTACATGTCGACTAGTCCCGGGCCCATGGATCCGCGGTACC
TGCAGAATTCTAGAGCTCGAGCTAGCGGCCGCATGCATCGATATGACTCTCTTAACATCTA
TGTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATGAAATGGCACTTAAGGTAGCCAAAAAGATCTCAGCG
CGC-3

序列中斜体字所示部分为 *LoxP* 位点; 标下划线部分为 *PI-SceI* 位点,
斜体加下划线部分为 *I-SceI* 位点; *PI-SceI* 位点和 *I-SceI* 位点之间的序
列是多克隆位点。

图 5 为构建多基因载体的限制性内切酶检测图。

组装过程中及完成后产生的含有不同数目基因的载体质粒用限制
性内切酶 *NotI* 消化并电泳。图下的数字表示载体装载有目的基因和 DNA
片段的数目。第 7—10 泳道的 5.2kb 条带、第 9—10 泳道的 1.2kb 条带、
以及第 10 泳道的 3.0kb 条带分别是 2 个基因片段的叠加 (参见图 6)。
M 泳道示 λ DNA/*HindIII* 分子量标准。

图 6 为多基因载体 pYL747-10G 的基因排列结构示意图。图中省
略了接受载体 pYL747 的骨架部分。括号内数字表示基因或 DNA 序列
组装的次序, N 表示在接头 S 和接头 V 中设计的限制性内切酶 *NotI* 位点,
或载体中以及 *Xa21* 基因中存在的 *NotI* 位点。*NotI* 位点之间的数字是 DNA
序列的长度 (kb)。

图 7 为多基因载体 pYL747-10G 转化水稻的分子杂交检测图。

将非转化体对照 (泳道 1)、多基因载体 pYL747-10G (泳道 2)、

和水稻转化体（泳道 3-12）用限制性内切酶 *Hind*III 消化、凝胶电泳分离和转移到杂交膜后，用图中所示的基因探针作分子杂交。泳道 M 是 λ DNA/*Hind*III 分子量标准。

本发明所述的载体系统可以按以下的步骤进行多基因的组装：

(1) 把多个目的基因按实际需要组装的次序排号，即基因 1、基因 2、基因 3、基因 4……。用常规的分子克隆技术把单序数和双序数的基因分别亚克隆到供给载体 I pYLVS 和供给载体 II pYLSV 中的多克隆位点。在技术难度上许可的情况下，也可以将 2 个或 2 个以上的基因亚克隆到一个供给载体，作为一个序号的基因用于以下的组装。所述的基因可以包括各种基因和 DNA 序列片段。

(2) 如图 2 之一所示，把载有基因 1 的供给载体 I 质粒 pYLVS-基因 1 和接受载体质粒 pYLTAC747 共转化到具有 Cre 重组酶基因的大肠杆菌宿主，Cre 重组酶使 2 种质粒在大肠杆菌细胞内发生重组整合。在选择培养基中用卡那霉素和氯霉素双抗筛选已整合的质粒，再转化到不具有 Cre 酶基因的大肠杆菌宿主，使整合质粒中的 2 个 LoxP 位点不再发生逆向重组。也可以用纯化的 Cre 重组酶使质粒 pYLVS-基因 1 和质粒 pYLTAC747 在试管内反应使之重组整合，再转化到不具有 Cre 重组酶基因的大肠杆菌宿主，用卡那霉素和氯霉素双抗筛选已整合的质粒。在整合质粒中有 2 个相反方向的 I-SceI 位点，用内切酶 I-SceI 将 2 个位点之间的供给载体 pYLVS 的骨架片段切除。由于 I-SceI 位点被切割后产生的粘性末端碱基是非对称结构，2 个相同的粘性末端之间不能互补配对，因此要用一个与之具有互补粘性末端的寡核苷酸接头 S 把整合质粒片段在 DNA T4 连接酶的作用下连接成环状。所产生的连接点不再被 I-SceI 识别和切割，因此在以后单序号基因的组装时再用 I-SceI 切除供给载体 pYLVS 的骨架片段也不会切断这个连接点。把连接的质粒转化大肠杆菌，先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆，再用含氯霉素的培养基鉴定出不抗氯霉素的克隆，此为已切除了 pYLVS 骨架片段并把基因 1 装进 pYLTAC747

的新质粒，命名为 pYLTAC747-基因 1。原来 pYLTAC747 中的 I-SceI 位点在新质粒 pYLTAC747-基因 1 中已被来源于 pYLSV 的 PI-Sce I 位点取代。

(3) 如图 2 之二所示，把载有基因 2 的供给载体 II 质粒 pYLSV-基因 2 和载有基因 1 的新接受载体质粒 pYLTAC747-基因 1 共转化到具有 Cre 重组酶基因的大肠杆菌宿主，使 2 种质粒在大肠杆菌细胞内发生重组整合。在选择培养基中用卡那霉素和氯霉素双抗筛选已整合的质粒，再转化到不具有 Cre 重组酶基因的大肠杆菌，使整合质粒中的 2 个 LoxP 位点不再发生逆向重组。也可以用纯化的 Cre 重组酶使质粒 pYLSV-基因 2 和质粒 pYLTAC747-基因 1 在试管内反应使之重组整合，再转化到不具有 Cre 重组酶基因的大肠杆菌宿主，用卡那霉素和氯霉素双抗筛选已整合的质粒。在整合质粒中有 2 个相反方向的 PI-SceI 位点，用内切酶 PI-SceI 将 2 个位点之间的供给载体 pYLSV 的骨架片段切除。由于 PI-SceI 位点被切割后产生的粘性末端碱基是非对称结构，因此要用一个与之具有互补粘性末端的寡核苷酸接头 V 把整合质粒在 DNA T4 连接酶的作用下连接成环状。所产生的连接点同样不再被 PI-SceI 识别和切割。把连接的质粒转化大肠杆菌，先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆，再用含氯霉素的培养基鉴定出不抗氯霉素的克隆，此为已切除了 pYLSV 骨架片段并把基因 2 也装进 pYLTAC747 的新质粒 pYLTAC747-基因 1-基因 2。原来 pYLTAC747-基因 1 中的 PI-SceI 位点在新质粒中已被来源于 pYLSV 的 I-Sce I 位点取代。其状态为图 2 之二所示。

以装载有目的基因的新质粒为接受载体，不断交替重复所述步骤(2)和步骤(3)，即按步骤(2)操作将单序数基因整合进接受载体，按步骤(3)操作将双序数基因整合进接受载体，直到完成所有目的基因或 DNA 片段的组装，构建多基因载体。

根据本发明的方法原理，多基因组装载体的结构及其组装方法也可以作一些改变。如可以用 3 个或 3 个以上的供给载体轮流与接受载体进行重组整合。以使用 3 个供给载体为例，可将接受载体和 3 个供给载体中的各种位点的位置关系可以设置为：

接受载体: RS-S1

供给载体 I: RS-S2-MCS-S1

供给载体 II: RS-S3-MCS-S2

供给载体 III: RS-S1-MCS-S3

其中 RS 是特异重组位点; S1, S2, S3 可以是内切酶位点, 优选的是 homing endonuclease 位点, 也可以是不可逆特异重组位点。多基因组装时各个供给载体的循环使用顺序是: 供给载体 I, 供给载体 II, 供给载体 III, 供给载体 I, 供给载体 II, 供给载体 III, 供给载体 I, ……。

本发明所述的多基因载体构建方法有多方面的用途。本发明可以用于构建适合各种转化方法的多基因转化载体, 以此载体将多个基因一起转化受体生物细胞, 获得多种基因工程产品或多个基因表达性状。这些转化方法包括但不限于农杆菌介导转化法、微弹轰击法、显微注射法、电激法、聚乙二醇法、花粉管通道法、病毒载体感染法。例如, 本发明所述的接受载体 pYL747 含有农杆菌介导的双元转化载体所需的元件如 T-DNA 区的右边界 RB 和左边界 LB、对细菌的抗生素选择标记卡那霉素抗性基因、以及农杆菌质粒复制子。因此在 pYL747 载体中装载了植物抗生素选择标记和其它目的基因后, 即可以用于农杆菌介导法转化, 也适用于其它方法转化。本发明也可以用于构建各种用途的基因工程载体, 特别是一些含有多个元件的大型载体如细菌人工染色体、酵母人工染色体、哺乳动物人工染色体、和植物人工染色体。

本发明具有的效果和优点:

(1) 可有效地将多个不同来源的基因或 DNA 片段按所需的次序组装在一个载体, 解决了现有方法所遇到的技术障碍。

(2) 采用 2 个或 2 个以上的供给载体交替地与接受载体进行多轮的重组整合, 可交替重复地使用 2 种或少数几种稀有内切酶位点或不可逆特异重组位点切除供给载体骨架, 使多轮的基因组装能有效地进行。

(3) 用负载容量大的复制子构建接受载体, 可承载多个外源基因和较大的 DNA 片段。

实施例

以下举例说明本发明的实施，但本发明不限于下面提供的应用，以下描述不对本发明的权利要求构成限制。

菌株和质粒：大肠杆菌菌株 DH10B、NS3529、根癌农杆菌菌株 EHA105、质粒载体 pBluescript SK+、pUC18、pYLTA7、pCAMBIA1200。

工具酶和化学试剂：限制性内切酶、homing endonuclease、小牛肠碱性磷酸酶（CIAP）、T4 DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、Klenow DNA 聚合酶购自 NEB 公司和 TaKaRa 公司，寡核苷酸引物和核苷酸片段的合成由 Sangon 生物技术公司定做，X-gal、IPTG、X-glue 购自 Sigma 公司， α - P^{32} dCTP 购自亚辉生物工程公司。

植物材料：水稻品种中花 11。

要组装的基因或功能 DNA 序列：抗潮霉素基因 HPT、核质附着区 MAR、雪花莲凝集素基因 GNA、马铃薯蛋白酶抑制剂基因 PinII、水稻酸性几丁质酶基因 RAC22、水稻碱性几丁质酶基因 RCH10、水稻抗白叶枯病基因 Xa21、抗除草剂基因 Bar、 β 葡萄糖苷酸酶基因 GUS。这些基因原分别装载在质粒载体 pBluescript SK+或 pUC18 中。

本实施例所用的基因工程基本操作技术一般按 Sambrook T 等在分子克隆实验手册（Sambrook T, Tanaka K, Monma T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989）中提供的方法进行，或按照试剂产品使用说明书的操作方法进行。所有质粒转化大肠杆菌和农杆菌采用电激导入法。

实施例 1：接受载体的构建

如图 3 所示，根据可转化人工染色体载体 pYLTA7 的序列(Liu et al., 1999) 合成了含有 *Xba*I 和 *Bam*HI 位点的引物 P1 和 P2（见图 3 的说明），用 PCR 方法扩增出 15690bp 的载体骨架片段，用 *Xba*I 和 *Bam*HI 切出粘性末端，再与合成的双链 DNA 片段 MCS—LoxP—I—*Sce*I（序列表中的序列 1）连接成环状，转化大肠杆菌 DH10B，获得接受载体 pYLTA747。

实施例 2: 供给载体 I 和供给载体 II 的构建

如图 4 所示, 根据氯霉素抗性基因的序列合成引物 P3 和 P4 (见图 4 的说明), 从质粒 pCambia1200 (Cambia 公司) 以 PCR 扩增出 826bp 的氯霉素抗性基因 *Cm*。根据质粒 pBluescript SK (Clontech 公司) 的序列合成引物 P5 和 P6, 从质粒 pBluescript SK 以 PCR 扩增出 1660bp 的 *Ori*—*MCS*—*LacZ* 片段。把这 2 个片段连接成环状, 转化大肠杆菌 DH10B, 获得一个中间产物质粒 pYL。用限制性内切酶 *Bss*HI 切除质粒 pYL 中的 *MCS*, 与合成的双链的 DNA 片段 *LoxP*—*PI*—*SceI*—*MCS*—*I*—*SceI* (序列表中的序列 2) 连接成环状, 转化大肠杆菌 DH10B, 获得一个供给载体 I 质粒, 命名为 pYLVS。质粒 pYLVS 的 *LoxP* 与 *PI*—*SceI* 之间以及 *I*—*SceI* 与 *LacZ* 之间分别设有 1 个限制性内切酶 *Bgl*III 位点。用 *Bgl*III 将 pYLVS 切成 2 个片段, 再重新连接和转化, 筛选出两个 *Bgl*III 位点之间的片段 *PI*—*SceI*—*MCS*—*I*—*SceI* 反向的质粒, 即各个位点相对位置变成 *LoxP*—*I*—*SceI*—*MCS*—*PI*—*SceI* (序列表中的序列 3) 的质粒, 此为供给载体 II, 命名为 pYLSV。

实施例 3: 多基因转化载体的组装

(1) 接受载体 pYLTAC747 上设置有多克隆位点, 用常规分子克隆方法可将少数基因直接克隆到该载体。本实施例首先将抗潮霉素基因 *HPT* 直接亚克隆到 pYLTAC747 的克隆位点中的 *Not*I 位点。所产生的载体 pYLTAC747HPT 如图 5 的泳道 2 所示。

(2) 将 *MAR* 序列 (1.2kb) 亚克隆到供给载体 I 质粒 pYLVS, 产生 pYLVS—*MAR*。将 pYLVS—*MAR* 和 pYLTAC747—*HPT* 共转化到含有 *Cre* 重组酶基因的大肠杆菌 NS3529 感受态细胞, 使 2 种质粒在大肠杆菌细胞内发生重组整合。用卡那霉素和氯霉素双抗选择整合的质粒, 再转化到不含 *Cre* 酶基因的大肠杆菌 DH10B。用 *I*—*SceI* 切除 pYLVS 骨架, 用 T4 DNA 连接酶把整合载体和人工合成的寡核苷酸接头 S (内设有 1 个 *Not*I 切点) 连接成环状质粒。转化到 DH10B, 先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的

克隆，再转移到含氯霉素的培养基，鉴定出不抗氯霉素的克隆。这一步骤完成后获得新质粒 pYLTAC747HPT-MAR，如图 5 的泳道 3 所示。

(3) 将 GNA 基因 (5.2kb) 亚克隆到供给载体 II 质粒 pYLSV，产生 pYLSV-GNA。将 pYLSV-GNA 和 pYLTAC747-MAR-HPT 共转化到 NS3529。用卡那霉素和氯霉素双抗选择整合的质粒，再转化到 DH10B。用 *PI-SceI* 切除 pYLSV 骨架，用 T4 DNA 连接酶把整合载体和寡核苷酸接头 V（内设有 1 个 *NotI* 切点）连接成环状质粒。转化到 DH10B，先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆，再转移到含氯霉素的培养基，鉴定出不抗氯霉素的克隆。这一步骤完成后获得新质粒 pYLTAC747HPT-MAR-GNA，如图 5 的泳道 4 所示。

(4) 将 PinII (3.0kb) 亚克隆到 pYLVS，产生 pYLVS-PinII。将 pYLVS-PinII 和 pYLTAC747HPT-MAR-GNA 共转化到 NS3529。用卡那霉素和氯霉素双抗选择整合的质粒，再转化到大肠杆菌 DH10B。用 *I-SceI* 切除 pYLVS 骨架，用 T4 DNA 连接酶把整合载体和接头 S 连接成环状质粒。转化到 DH10B，先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆，再转移到含氯霉素的培养基，鉴定出不抗氯霉素的克隆。这一步骤完成后获得新质粒 pYLTAC747HPT-MAR-GNA-PinII，如图 5 的电泳图泳道 5 所示。

(5) 将原来克隆在同一个质粒载体的 2 个基因 RAC22/RCH10 基因 (6.4kb) 亚克隆到 pYLSV，产生 pYLSV-RAC22/RCH10。将 pYLSV-RAC22/RCH10 和 pYLTAC747HPT-MAR-GNA-PinII 共转化到 NS3529。用卡那霉素和氯霉素双抗选择整合的质粒，再转化到 DH10B。用 *PI-SceI* 切除 pYLSV 骨架，用 T4 DNA 连接酶把整合载体和接头 V 连接成环状质粒。转化到 DH10B，先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆，再转移到含氯霉素的培养基，鉴定出不抗氯霉素的克隆。这一步骤完成后获得新质粒 pYLTAC747HPT-MAR-GNA-PinII-RAC22/RCH10，如图 5 的泳道 6 所示。

(6) 将 Xa21 (9.7kb) 亚克隆到 pYLVS，产生 pYLVS-Xa21。将 pYLVS-Xa21 和 pYLTAC747HPT-MAR-GNA-PinII-RAC22/RCH10 共转化到 NS3529。用

卡那霉素和氯霉素双抗选择整合的质粒，再转化到大肠杆菌 DH10B。用 *I-SceI* 切除 pYLSV 骨架，用 T4 DNA 连接酶把整合载体和接头 S 连接成环状质粒。转化到 DH10B，先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆，再转移到含氯霉素的培养基，鉴定出不抗氯霉素的克隆。这一步骤完成后获得新质粒 pYLTA747HPT-MAR-GNA-PinII-RAC22/RCH10-Xa21，如图 5 的泳道 7 所示（注：Xa21 基因内部有 2 个 *NotI* 位点）。

（7）将 Bar 基因（1.8kb）亚克隆到 pYLSV，产生 pYLSV-Bar。将 pYLSV-Bar 和 pYLTA747HPT-MAR-GNA-PinII-RAC22/RCH10-Xa21 共转化到 NS3529。用卡那霉素和氯霉素双抗选择整合的质粒，再转化到 DH10B。用 *PI-SceI* 切除 pYLSV 骨架，用 T4 DNA 连接酶把整合载体和接头 V 连接成环状质粒。转化到 DH10B，先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆，再转移到含氯霉素的培养基，鉴定出不抗氯霉素的克隆。这一步骤完成后获得新质粒 pYLTA747HPT-MAR-GNA-PinII-RAC22/RCH10-Xa21-Bar，如图 5 的泳道 8 所示。

（8）将上述步骤（2）的 pYLSV-MAR 和 pYLTA747HPT-MAR-GNA-PinII-RAC22/RCH10-Xa21-Bar 共转化到 NS3529。用卡那霉素和氯霉素双抗选择整合的质粒，再转化到大肠杆菌 DH10B。用 *I-SceI* 切除 pYLSV 骨架，用 T4 DNA 连接酶把整合载体和接头 S 连接成环状质粒。转化到 DH10B，先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆，再转移到含氯霉素的培养基，鉴定出不抗氯霉素的克隆。这一步骤完成后获得新质粒 pYLTA747HPT-MAR-GNA-PinII-RAC22/RCH10-Xa21-Bar-MAR，如图 5 的泳道 9 所示。

（9）将 LB/GUS/RB 序列（3.0kb）亚克隆到 pYLSV，产生 pYLSV-LB/GUS/RB。将 LB/GUS/RB 和 pYLTA747HPT-MAR-GNA-PinII-RAC22/RCH10-Xa21-Bar-MAR 共转化到 NS3529。用卡那霉素和氯霉素双抗选择整合的质粒，再转化到 DH10B。用 *PI-SceI* 切除 pYLSV 骨架，用 T4 DNA 连接酶把整合载体和接头 V 连接成环状质粒。转化到 DH10B，先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆，再转移到含氯霉素的培

培养基，鉴定出不抗氯霉素的克隆。这一步骤完成后获得新质粒 pYLTAC747HPT-MAR-GNA-PinII-RAC22/RCH10-Xa21-Bar-MAR-LB/GUS/RB，如图 5 的泳道 10 所示。

组装完成的多基因载体共含有 10 个外源基因和功能 DNA 序列，命名为 pYLTAC747-10G（图 6）。本实施例说明本发明所述的方法可有效地把多个基因和 DNA 序列组装到一个载体。

实施例 4：多基因转化载体的水稻转化

把质粒 pYLTAC747-10G 导入农杆菌 EHA105，获得含有 pYLTAC747-10G 的农杆菌 EHA105(pYLTAC747-10G)，用于转化水稻胚愈伤组织。pYLTAC747-10G 含有由潮霉素抗性基因 HPT 和除草剂抗性基因 Bar，因此水稻转化体可用潮霉素和除草剂 Basta 进行筛选。将水稻成熟种子或未成熟种子的胚在诱导培养基上，在 25°C 黑暗条件下诱导愈伤组织。成熟种子的愈伤组织 14 天后、未成熟种子的愈伤组织 4 天后转移到继代培养基培养。把 EHA105(pYLTAC747-10G) 在 YM 琼脂培养基 28°C 培养 1 天，收集在含有 100μmol/L 的乙酰丁香酮的 40ml MB 液体培养基，28°C 培养至 OD₅₅₀=0.5-1.0。将水稻愈伤组织浸入菌液 20 分钟，吸干菌液后转移到 MB 琼脂培养基，25°C 黑暗条件下培养 3 天。转移愈伤组织至含有 50mg/L 潮霉素的培养基培养，每 14 天继代一次，继代 2 次。抗性筛选后，转入再生培养基分化出转化苗，获得转化植株。

实施例 5：水稻转化植株的分子杂交鉴定

从水稻转化植株提取基因组 DNA，用限制性内切酶 *Hind*III 酶切和琼脂糖凝胶电泳。以转化所用的一些基因和 DNA 序列为探针进行 Southern 印迹分子杂交，发现外源基因序列已导入到水稻基因组中（图 7）。这些结果说明用本发明所述方法构建的多基因载体可有效地把所负载的多个基因导入植物基因组。

序 列 表

序列 1

(a) 分子类型: DNA

(b) 长度: 118 碱基

(c) 序列:

```
ggatccaagc ttgtcgacgg ccggccgcgg ccgcataact tcgtatagca tacattatac 60
gaagttatgg gccgcattac cctgttatcc ctaggccccca attaggccta cccactag 118
```

序列 2

(a) 分子类型: DNA

(d) 长度: 245 碱基

(c) 序列:

```
gcgcgctcat aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt atcagatctt ttgggctacc 60
ttaagtgeca ttccattacc tttttctcgg caccgcacat agatgttaag agagtcatat 120
cgatgcatgc ggccgcctagc tcgagctcta gaattctgca ggtaccgcgg atccatgggc 180
ccgggactag tcgacatgta caagcttgta gggataacag ggtaatccct aagatctcag 240
cgcg 245
```

序列 3

(a) 分子类型: DNA

(b) 长度: 118 碱基

(c) 序列:

```
gcgcgctcat aacttcglat agcatacatt atacgaagtt atcagatctt agggattacc 60
ctgttatccc tacaagcttg tacatgtcga ctagtcccgg gcccatggat ccgcgggtacc 120
tgcagaattc tagagctcga gctagcggcc gcatgcatcg atalgactct cttaacatct 180
atgtcgggtg cggagaaaga ggtaatgaaa tggcacttaa ggtagccaaa aagatctcag 240
cgcg 245
```

说明书附图

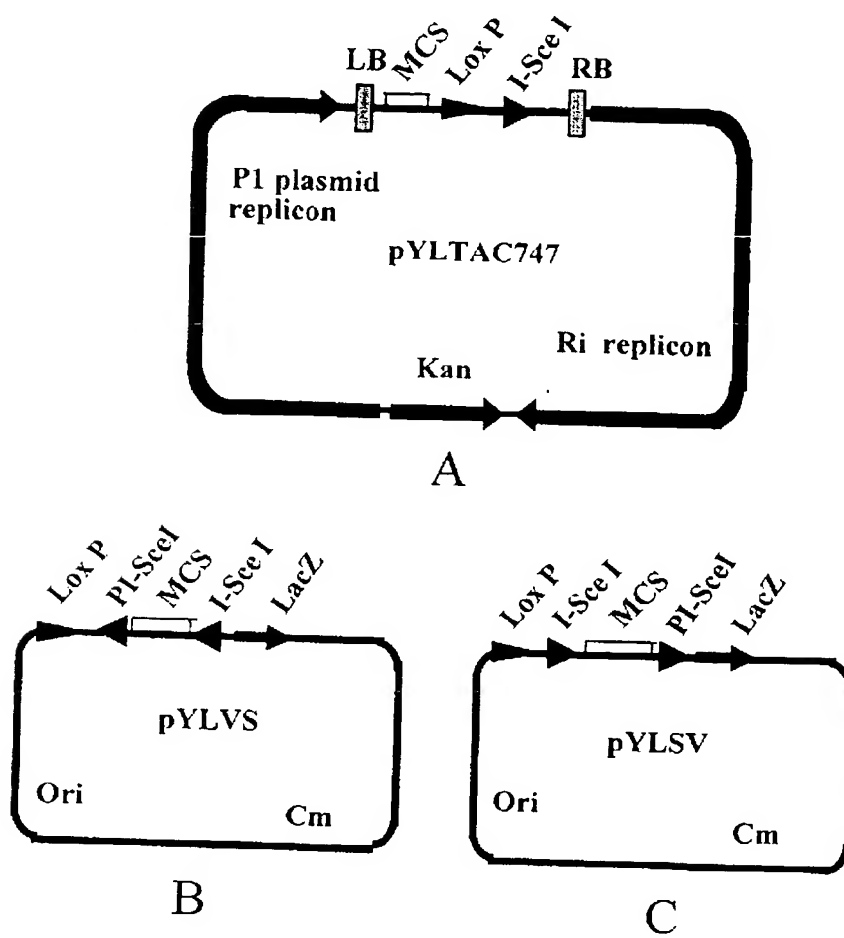


图 1

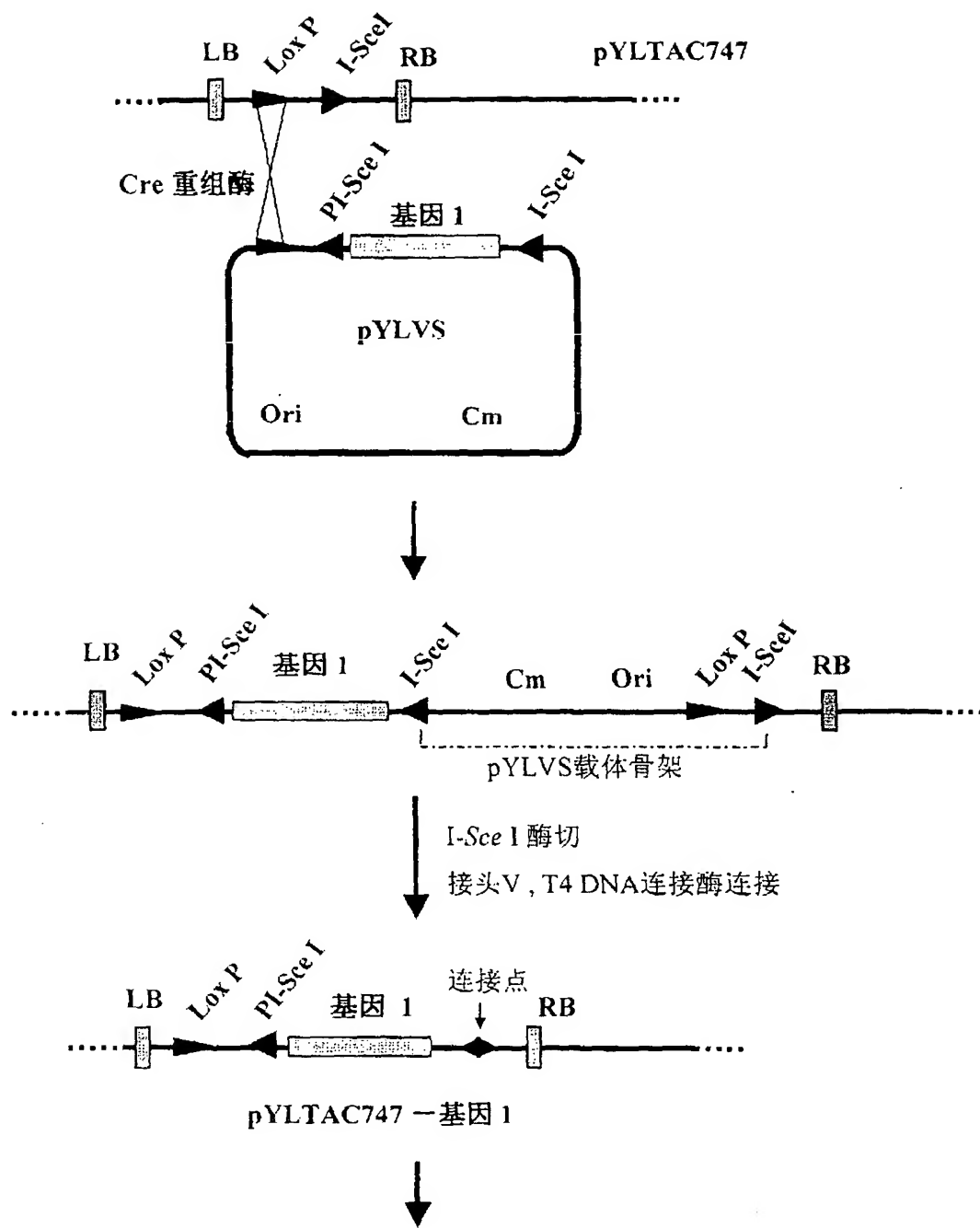


图 2 (之一)

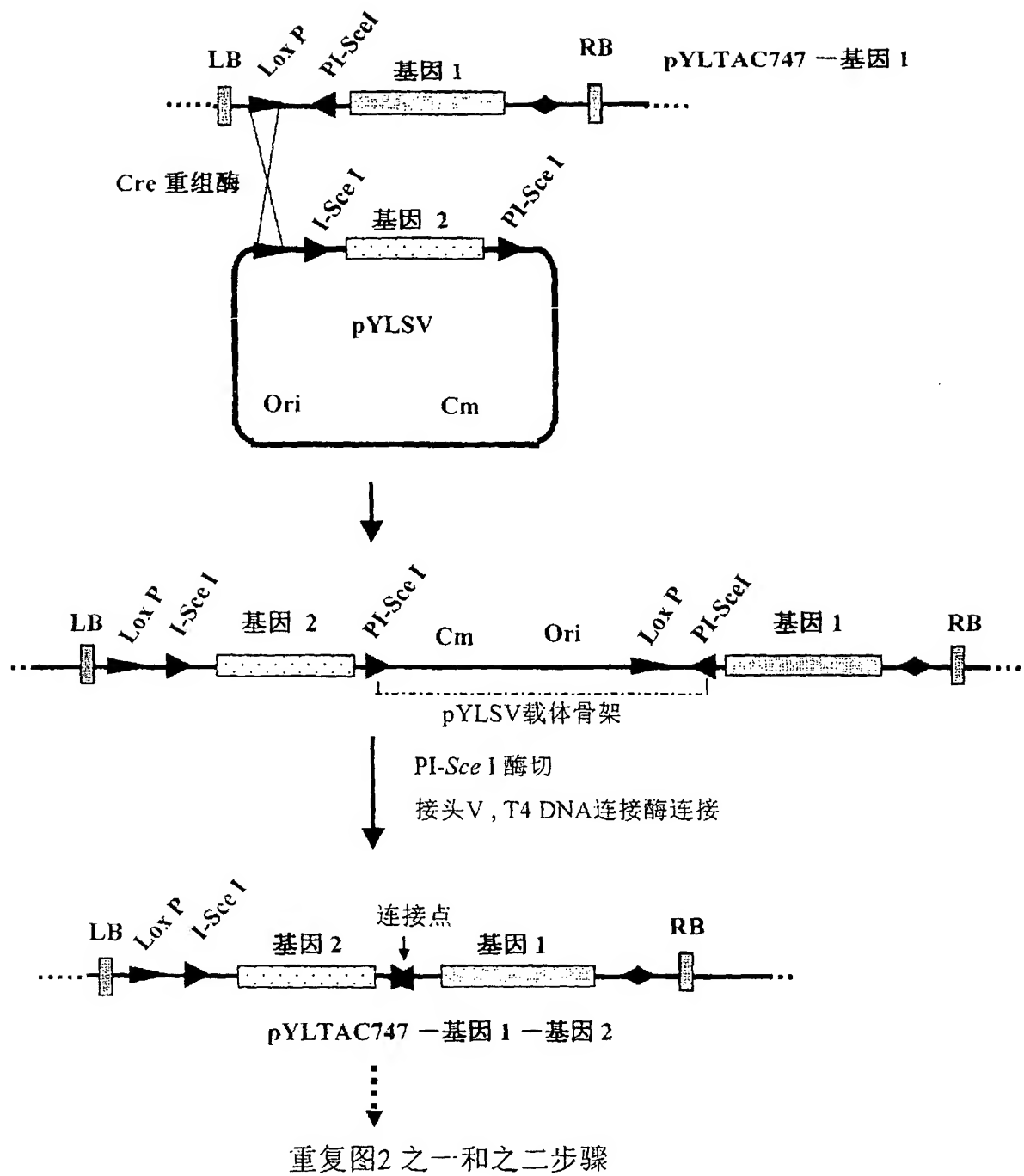


图 2 (之二)

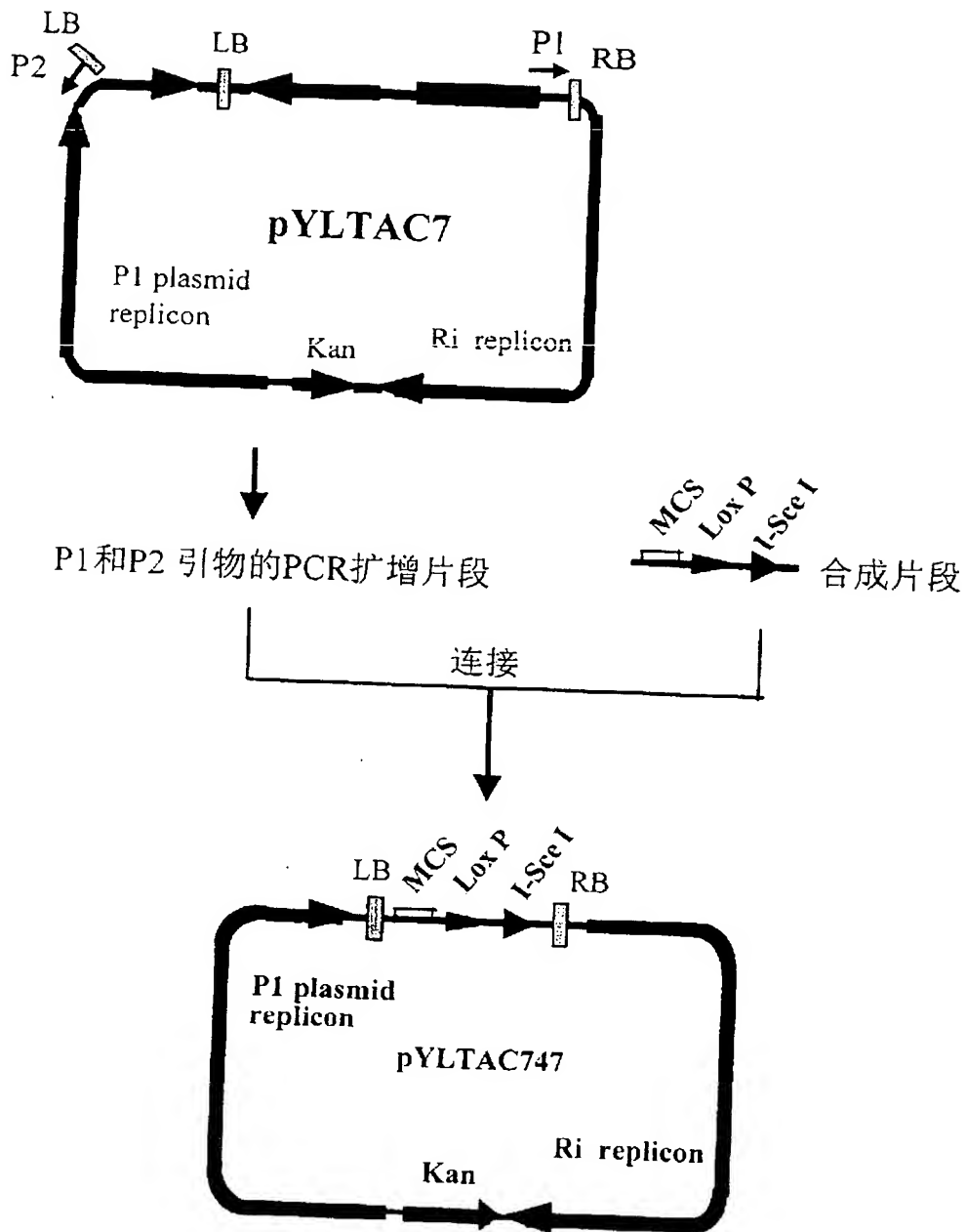


图 3

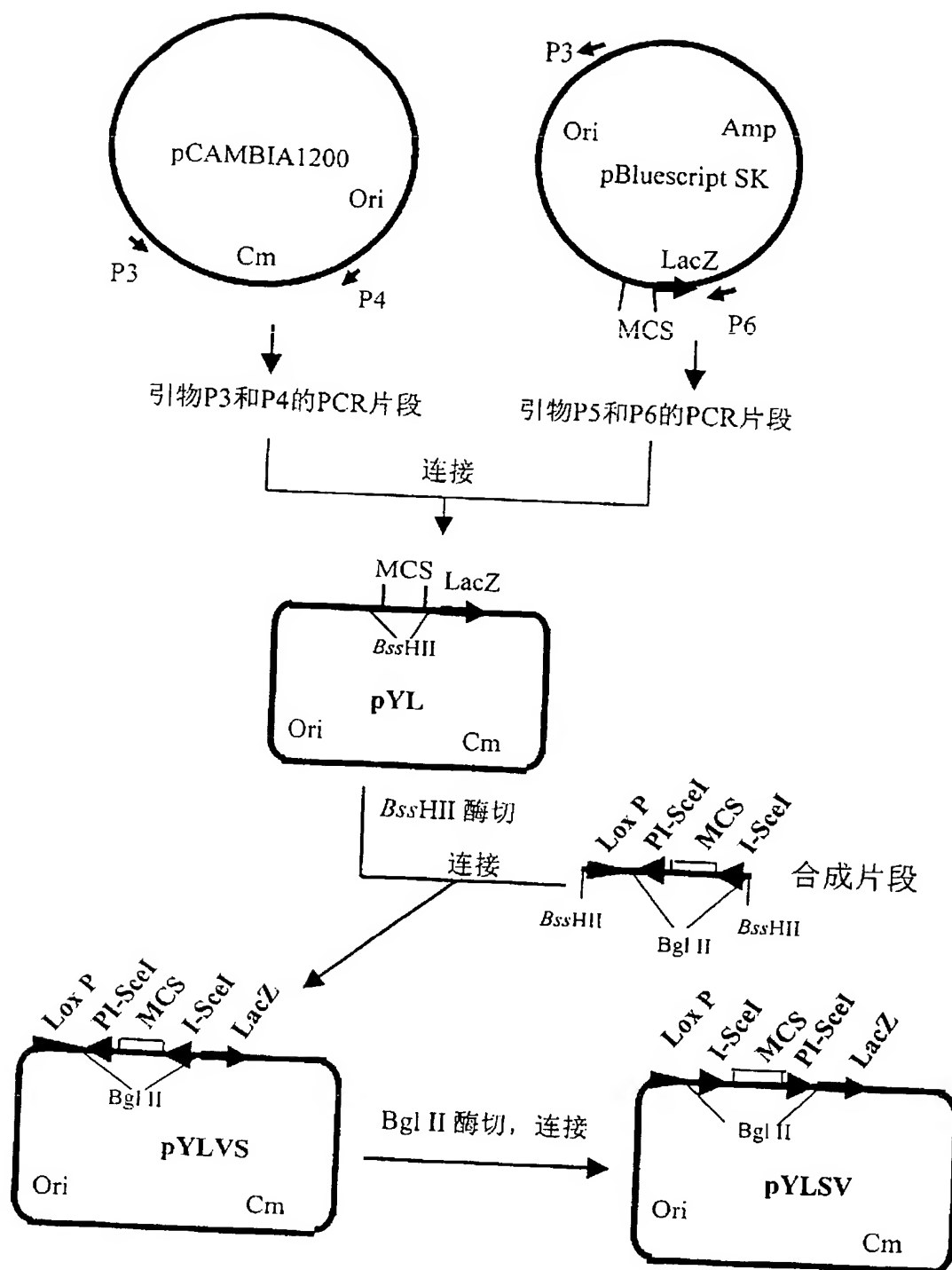


图 4

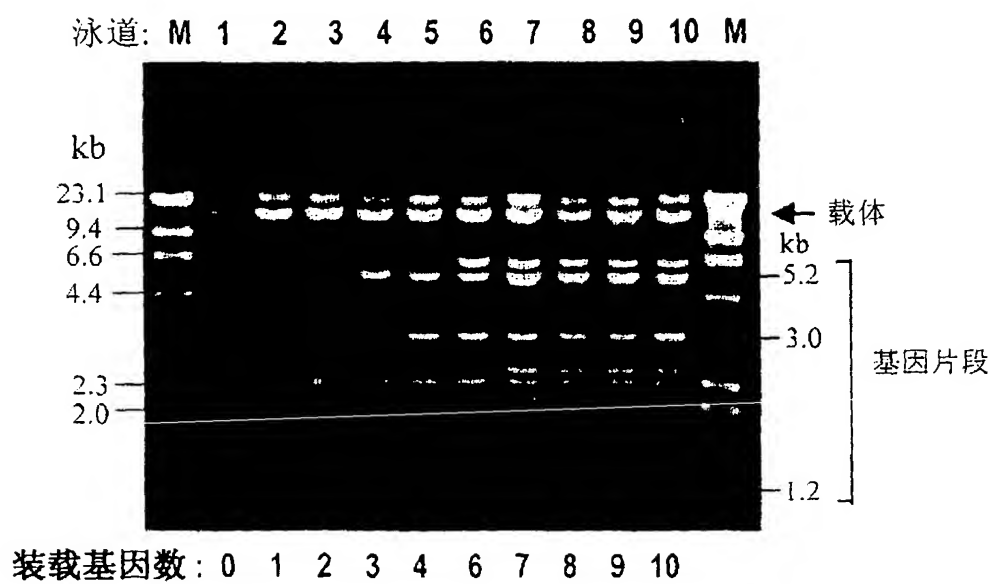


图 5

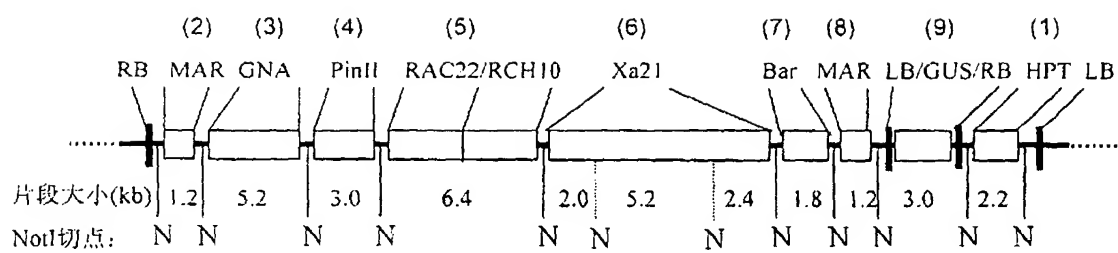


图 6

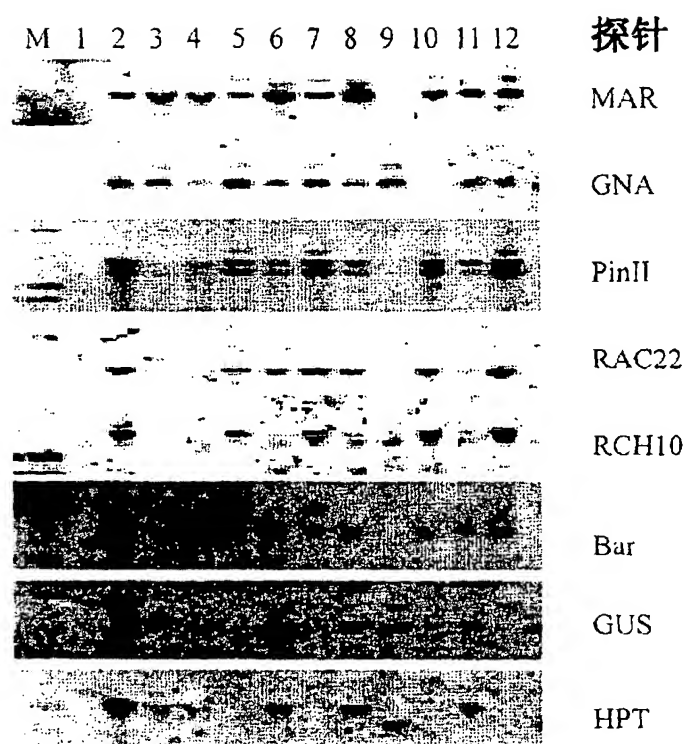


图 7